

Ambiente genético del Gen *bla*_{CTX-M-12} en aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*

The *bla*_{CTX-M-12} gene's genetic environment in *Klebsiella pneumoniae* hospital isolates

Yamile Adriana Celis Bustos, Ingrid Yamile Pulido Manrique, Emilia María Valenzuela de Silva, María Teresa Reguero Reza, José Ramón Mantilla Anaya¹

Resumen

En Colombia se han detectado genes del grupo CTX-M-1 con alta frecuencia en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* causantes de infección intrahospitalaria. El conocimiento de los factores genéticos que pueden favorecer la diseminación de estos genes entre especies bacterianas es un aspecto importante para el control de la resistencia. En este estudio se identificaron los plásmidos portadores del gen *bla*_{CTX-M-12} en 21 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. Se evaluó por conjugación la transferencia de resistencia a antibióticos. Integrones, secuencias de inserción y otros elementos genéticos fueron detectados por amplificación del ADN plasmídico con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante análisis por PCR se determinó la relación entre el gen *bla*_{CTX-M-12} y los elementos genéticos detectados. En todos los aislamientos, el gen *bla*_{CTX-M-12} se encontró en plásmidos conjugativos de tamaños entre 65 y 106 kpb. La transferencia por conjugación de estos elementos móviles puede explicar la amplia diseminación de este gen entre enterobacterias causantes de infección nosocomial en hospitales de Bogotá, Colombia. El gen *bla*_{CTX-M-12} se encontró corriente abajo de *ISEcp1*, secuencia de inserción que se ha asociado con la movilización de determinantes genéticos de resistencia. Los promotores de *ISEcp1*, detectados por análisis de secuencia, pueden facilitar la expresión de la cefotaximasa codificada por este gen.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, elementos genéticos móviles, gen *bla*_{CTX-M-12}, plásmidos conjugativos, *Klebsiella pneumoniae*.

Abstract

Genes from CTX-M-1 group have been detected with great frequency in Colombia in intrahospital infection-causing *Klebsiella pneumoniae* isolates. Knowledge regarding the genetic factors favouring such genes' dissemination amongst bacterial species is an important issue for resistance control. *bla*_{CTX-M-12} gene-carrying plasmids were identified in this study in 21 clinical *K. pneumoniae* isolates. Antibiotic resistance transfer was evaluated by mating. Integrons, insertion sequences and other genetic elements were detected by plasmid DNA amplification using polymerase chain reaction (PCR). The relationship between the *bla*_{CTX-M-12} gene and other genetic elements was determined by PCR analysis. The *bla*_{CTX-M-12} gene was

1 Laboratorio de Epidemiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

found on 52 to 106 Kpb conjugative plasmids in all isolates. These mobile elements' transfer by mating may explain their wide dissemination amongst nosocomial infection-causing enterobacteria in hospitals in Bogota, Colombia. The *bla*_{CTX-M-12} gene was found downstream from *ISEcp1*, this being an insertion sequence which has been associated with resistance genetic determinants' mobilisation. *ISEcp1* promoters (detected by sequence analysis) may increase the expression of cefotaximase encoded by this gene.

Key words: antibiotic resistance, mobile genetic element, the *bla*_{CTX-M-12} gene, conjugal plasmid, *Klebsiella pneumoniae*.

Recibido: febrero 10 de 2009

Aprobado: junio 16 de 2009

Introducción

La resistencia a antimicrobianos se ha convertido en un problema global debido a la amplia diseminación de diversos genes de resistencia entre especies bacterianas causantes de infección. Con el incremento del uso de cefalosporinas de tercera generación surgieron, por selección, cepas bacterianas con capacidad de expresar diferentes clases de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Dentro de este grupo de enzimas, las cefotaximasas del tipo CTX-M son consideradas actualmente como las más diseminadas en el mundo (Jacoby et ál., 2005; Bonnet, 2004; Cantón et ál., 2008; Livermore et ál., 2008). *Klebsiella pneumoniae*, productora de BLEE, es la especie causante de infección nosocomial más frecuente en América Latina (Villegas et ál., 2008). En Bogotá Colombia, el grupo de Epidemiología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia ha encontrado alta prevalencia de genes que codifican para cefotaximasas del grupo CTX-M-1 y, entre éstos, el gen *bla*_{CTX-M-12} fue el que se encontró en mayor proporción en aislamientos de *K. pneumoniae* causantes de infección intrahospitalaria (Leal et ál., 2003; Mantilla et ál., 2004; Mantilla et ál., 2006; Valenzuela et ál., 2006). Este gen, descrito inicialmente por Kariuki en África (Kariuki et ál., 2001), fue detectado por primera vez en Colombia en aislamientos de *K. pneumoniae* causantes de un brote en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de un hospital de tercer nivel de Bogotá (Leal et ál., 2003).

Algunos de los genes que codifican para estas β -lactamasas se localizan en plásmidos que a menudo contienen otros genes de resistencia, tales como los genes *qnr* que confieren resistencia a fluoroquinolonas, genes *aacC2*, *strA* y *strB* a aminoglicósidos, *catA2* a cloramfenicol, *sul1* a sulfonamidas y *dfrA14* a trimetoprim, entre otros (Ying-Tsong Chen et ál., 2006); en estos plásmidos también se han encontrado elementos genéticos tales como secuencias de inserción, integrones y transposones que pueden estar involucrados en el reclutamiento de genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos, en la movilización y expresión de la multiresistencia (Poirel et ál., 2008; Bennett et ál., 2008; Cantón et ál., 2006).

Los determinantes genéticos asociados con corresistencias pueden estar incluidos en la misma estructura genética, como en las denominadas islas de patogenicidad y de resistencia, descritas para diversas especies bacterianas, o encontrarse asociados con plataformas genéticas móviles (Depardieu et ál., 2007). Entre las plataformas móviles más comúnmente descritas como portadoras de genes de resistencia se encuentran los plásmidos, elementos genéticos extracromosomales en los que se pueden ensamblar genes que les proporcionan a las bacterias características importantes para su supervivencia. Los plásmidos pueden poseer o integrar elementos genéticos que permiten el reclutamiento de genes de resistencia y a su vez pueden servir como vehículos para la disemi-

nación de dichos genes por procesos de transformación o conjugación (Bennet et ál., 2008).

El objetivo de este estudio fue describir el entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-12} detectado en aislamientos hospitalarios de *K. pneumoniae* resistentes a múltiples antibióticos (MR). El conocimiento de las características moleculares que se encuentren asociadas con este determinante genético de resistencia será importante para el control de la resistencia a antibióticos.

Materiales y métodos

Se evaluaron 21 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* causantes de infección hospitalaria, recolectados entre los años 2005 al 2007 en hospitales de tercer nivel de Bogotá, Colombia. Todos los aislamientos eran portadores del gen *bla*_{CTX-M-12} identificado por Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP) y secuenciación (Velandia, 2008).

Susceptibilidad a antibióticos

Se evaluó la susceptibilidad a antibióticos mediante la técnica de difusión en disco en agar, de acuerdo con los parámetros establecidos por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Se incluyeron los siguientes antibióticos: penicínicos (ampicilina, piperacilina), monobactámicos (aztreonam), cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, ceftazidima y cefotaxime), cefalosporinas de cuarta generación (cefepime), aminoglicósidos (amikacina, gentamicina y estreptomycin), carbapenémicos (imipenem), quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina), rifamicinas (rifampicina), tetraciclinas y mezcla de sulfas con inhibidores de folato (trimetoprim/sulfametoxazol). Se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como control.

Ensayos de transferencia de resistencia

La conjugación se realizó en medio líquido de acuerdo con lo descrito por Eckert (Eckert et ál., 2006) utilizando como cepa receptora la

Escherichia coli CAG12177 resistente a ácido nalidíxico. Se compararon los perfiles plasmídicos de los aislamientos donantes y de los respectivos transconjugantes obtenidos. Se evaluó la transferencia del gen de interés, mediante amplificación por PCR del gen empleando como molde ADN total y del ADN plasmídico de los transconjugantes. Además, se evaluó la transferencia de la resistencia, utilizando sensidiscos de los siguientes antibióticos: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, aztreonam, ampicilina, piperacilina, gentamicina y amikacina.

Detección de genes codificantes de β -lactamasas

La detección de genes *bla*_{CTX-M} que codifican cefotaximasas del grupo CTX-M-1 se realizó mediante amplificación por PCR, en 15 μ l del volumen de reacción que contenía, 1 μ M de cada uno de los iniciadores referenciados en la tabla 1, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,04 Unidades de *Taq*-ADN polimerasa por μ L de reacción en solución amortiguadora 1X suministrada por Invitrogen, y aproximadamente 10 ng de ADN total o de ADN plasmídico. La reacción se realizó en un termociclador iCycler® (Biorad Laboratories), mediante desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, seguidos de 5 min de extensión final a 72 °C. Para la obtención del ADN total de las muestras se utilizó la técnica de lisis celular por calentamiento en baño de agua en ebullición informada por Chanowang et ál. (2002), y el ADN plasmídico como se describe adelante.

Extracción de plásmidos y evaluación de plásmidos portadores del gen *bla*_{CTX-M-12}

El ADN plasmídico fue obtenido por el método de termólisis alcalina: las células de 10 ml de un cultivo en caldo LB con absorbancia 0,7 a 600 nm fueron suspendidas en 100 μ l de solución de pre-lisis (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris.HCl 25 mM, pH 8,0) luego

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de genes *bla* y para la detección de elementos genéticos relacionados con genes *bla*_{CTX-M-12}

Elemento genético	Nombre iniciador	Secuencia (5'-3') de iniciadores	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-MA	CGC TTT GCG ATG TGC AG	Bonnet, 2001
	CTX-MB	ACC GCG ATA TCG TTG GT	Bonnet, 2001
<i>Int1</i>	Int1-F	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	Machado, 2005
	Int1-R	GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG	Machado, 2005
<i>Sul1</i>	Sul1-F	GCG CGG GTT TCC GCC TTG GGA	Novais, 2006
	Sul1-R	GC AAG GCC GAA ACC CGC G	Novais, 2006
<i>qacEΔ1</i>	qacEΔ1-F	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT	Novais, 2006
	qacEΔ1-R	CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC	Novais, 2006
<i>ISEcp1</i>	ISEcp1-F	TTC AAA AAG CAT AAT CAA AGC	Eckert, 2006
	ISEcp1-R	CAA CCA CCT TTC AAT CAT TTT T	Eckert, 2006
<i>IS26</i>	IS26-F	TCA CTC CAC GAT TTA CCG CT	Mammeri, 2005
	IS26-R	CTT ACC AGG CGC ATT TCG CC	Mammeri, 2005
<i>IS903</i>	IS903-F	CAT ATG AAA TCA GCG C	Poirel, 2003
	IS903-R	CCG TAG CGG GTT GTG TTT TC	Poirel, 2003

se mezclaron con 200 µl de solución de lisis (Tris 50 mM, SDS 4% pH 12,6) e incubaron a 65 °C durante 30 min. Se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión suave durante 5 min, y se centrifugó a 4° C durante 20 min a 20.000 g. El ADN plasmídico de la fase acuosa se separó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM) y bromuro de etidio 1µg/ml, bajo las siguientes condiciones: una hora a 1 vol/cm, dos horas a 1,8 vol/cm y tres horas a 3 vol/cm. El registro fotográfico, digitalización y análisis del tamaño de los plásmidos se realizó con el programa Quantity One® y el digitalizador Gel Doc® de Biorad

Para la detección por PCR de los genes de resistencia en el ADN plasmídico separado por

electroforesis, la porción de agarosa con cada una de las bandas de ADN separadas se pesó en un tubo de microcentrifuga, se adicionaron 10 volúmenes de agua desionizada esterilizada, se calentó durante 5 min a 94 °C, se homogeneizó durante 10 segundos en “vórtex” e inmediatamente se utilizaron 3 µl para un volumen de reacción de 15 µl bajo las condiciones de amplificación por PCR descritas anteriormente.

Para determinar el tamaño de los plásmidos obtenidos por termolisis alcalina, 50 µl de la fase acuosa (aproximadamente 1 µg de ADN), fueron digeridos con 1 unidad de nucleasa S1 (Invitrogen) a 37 °C durante 10 a 20 min, bajo las condiciones descritas (Ausubel et ál., 2003). Se adicionó 1µl de EDTA 0,5 M para detener la acción de la nucleasa. Los plásmidos en forma lineal se separaron

mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGGE).

Entorno genético del gen bla_{CTX-M-12}

La detección de elementos genéticos que aparecen en la tabla 1, que se han encontrado asociados con genes *bla_{CTX-M}* y a otros genes de resistencia (Levesque et ál., 1995; Lartigue et ál., 2004; Eckert et ál., 2006), se realizó mediante amplificación por PCR de ADN plasmídico. Para establecer la asociación de los elementos genéticos detectados y su posición con respecto al gen *bla_{CTX-M-12}* se utilizaron 6 pares de iniciadores (ver tabla 1) utilizando la estrategia de “mapeo por PCR”. Así, la ubicación corriente arriba del gen *bla_{CTX-M-12}* se determinó combinando los iniciadores directos de los determinantes genéticos detectados (*ISEcp1*, *IS26*, *ISCR1*) con el iniciador reverso CTX-MB. Para conocer el ambiente genético de la región corriente abajo, se combinaron los iniciadores reversos de las secuencias *IS903*, *qacEΔ*, *sull* con el iniciador directo CTX-MA. Para la estrategia de “mapeo por PCR” se utilizaron las mismas condiciones de amplificación usadas para la detección de genes *bla_{CTX-M-12}* previamente descritas.

Resultados y discusión

Perfil de susceptibilidad a antibióticos, transferencia de resistencia por conjugación y evaluación de plásmidos portadores del gen bla_{CTX-M-12}

El perfil de susceptibilidad de los 21 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* incluidos en el estudio mostró que 16 de los aislamientos presentaban resistencia a más de cuatro grupos de antibióticos por lo que se consideraron multiresistentes. Todos fueron resistentes a rifampicina, a β-lactámicos de amplio espectro (ampicilina, piperacilina), al monobactámico aztreonam y a las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftriaxona; frente a ceftazidima fueron resistentes 16/21, y a cefepime (cefalosporina de cuarta generación)

fueron resistentes 17 de los 21 aislamientos. La resistencia a aminoglicósidos fue 19/21 a estreptomycin, 12/21 a amikacina y 8/21 a gentamicina. Con respecto a quinolonas el 4/21 fueron resistentes a ciprofloxacina, 6/21 a ácido nalidixico; 13 de 21 fueron resistentes a tetraciclina y a trimetoprim-sulfametoxazol. Todos los aislamientos fueron sensibles a imipenem (ver figura 1).

Para poner de manifiesto la transferencia de la resistencia en los 21 aislamientos en estudio se realizaron los ensayos de conjugación. Tres aislamientos no fueron incluidos en los procedimientos de conjugación debido a la falta de una cepa receptora apropiada ya que estos aislamientos presentaron resistencia a los antibióticos que se podían utilizar para la selección de los transconjugantes. Con los dieciocho aislamientos restantes se obtuvieron transconjugantes de *Escherichia coli* resistentes a cefotaxima, piperacilina y aztreonam. En estos transconjugantes se detectó, por PCR, el gen *bla_{CTX-M-12}*, por lo cual es posible afirmar que este gen se encuentra localizado en plásmidos conjugativos y que la resistencia a los antibióticos antes mencionados se debe a la expresión por *E. coli* de la cefotaximasa CTX-M-12. Dichos plásmidos presentaron tamaños que oscilan entre 52 y 106 kpb aproximadamente (tabla 2). Este resultado confirma la participación de plásmidos conjugativos en la diseminación de genes que codifican para cefotaximasas entre aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y posiblemente pueden estar involucrados en la movilización de estos genes a otras especies de enterobacterias. La presencia del gen *bla_{CTX-M-12}* en plásmidos de alto peso molecular detectados en este estudio contrasta con lo informado por Bae et ál. (2006) con respecto al gen *bla_{CTX-M-12}*, detectado en tres aislamientos de *Escherichia coli* en un plásmido relativamente pequeño de aproximadamente 18 kpb, de igual manera el tamaño de los plásmidos encontrados en los aislamientos incluidos en este estudio fue inferior al informado por Kariuki (2001) en aislamientos de *K. pneumoniae* con un tamaño de 120kpb.

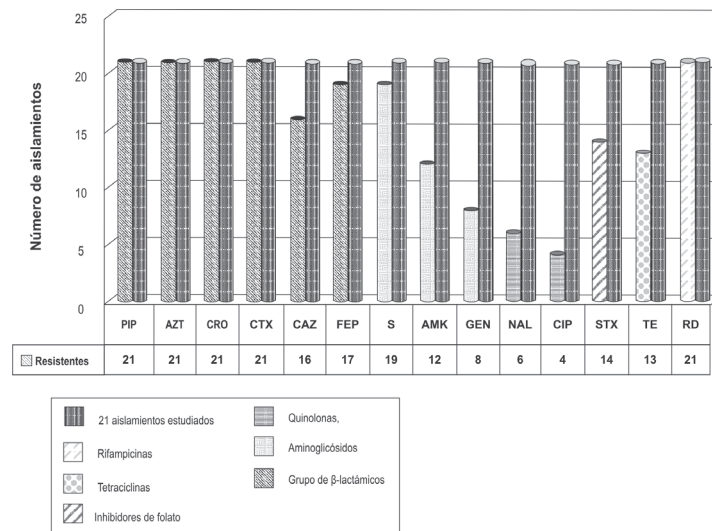


Figura 1. Frecuencia de aislamientos resistentes según el grupo de antibiótico.

De las 18 cepas de *E. coli* transconjugantes que adquirieron el gen *bla*_{CTX-M-12}, 11 fueron resistentes a ceftazidima (CAZ) y correspondieron específicamente a las que se obtuvieron por conjugación con los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a CAZ. Sin embargo, se ha encontrado que algunas mutaciones puntuales pueden variar la actividad hidrolítica de algunas BLEE del tipo CTX-M, debido a que dichas mutaciones le confieren a estas variantes una mayor afinidad sobre otras cefalosporinas como ceftazidima y cefepime (Gniadkowski et ál., 2008, Bae et ál., 2006).

La resistencia a cefepime (FEP) –cefalosporina de cuarta generación– fue transferida desde 12 de los 16 aislamientos resistentes a este antibiótico, actividad que no pudo ser atribuida a la cefotaximasa codificada por el gen *bla*_{CTX-M-12}. Estudios realizados en Corea (Bae et ál., 2006) con el gen *bla*_{CTX-M-12}, obtenido de aislamientos de *E. coli*, informan actividad hidrolítica sobre FEP por la cefotaximasa codificada por este gen. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio y por Pulido en el 2006, indican que la actividad sobre cefepime se debe a la acción de los productos de otros genes como los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} detectados en algunos de los aislamientos en estudio o por la presencia del gen *bla*_{CTX-M-12} asociado con otros mecanismos de resistencia como pueden

ser la sobreproducción de bombas de eflujo o alteraciones en las proteínas de membrana externa (Iran et ál., 2009).

La resistencia al aminoglicósido gentamicina fue transferida por conjugación desde 5 de 7 de los aislamientos resistentes a este antibiótico, y en el caso de la resistencia a amikacina desde 5 de 11 de los aislamientos. En 4 de los 5 aislamientos de *E. coli* transconjugantes que mostraron resistencia a amikacina, se observó un único plásmido de resistencia, de aproximadamente 65 kpb, en el que se encontró localizado el gen *bla*_{CTX-M-12}. La co-transferencia de la resistencia a los dos aminoglicósidos solamente se observó desde un aislamiento que poseía tres plásmidos con tamaños de 10, 65 y 98 kpb. En los demás casos no fue posible asociar el fenotipo de resistencia detectado en los transconjugantes de *E. coli* con una plataforma de movilización específica, puesto que el perfil plasmídico de los transconjugantes fue idéntico al observado en los aislamientos de origen, y estos a la vez poseen dos o más plásmidos de diferente tamaño (ver tabla 2).

El gen *bla*_{CTX-M-12} de 15 de los aislamientos se encontró ubicado en un plásmido común con un tamaño aproximado 65 kpb, en los otros tres se detectó en plásmidos de 65 a 106 kpb. El hecho de encontrar el gen *bla*_{CTX-M-12} en

plásmidos de diferentes tamaños moleculares, indica que estos plásmidos posiblemente han evolucionado por la adquisición de otros elementos genéticos, o que este gen ha sido transferido de un plásmido a otro probablemente por acción de secuencias de inserción o transposones que facilitan dicha movilidad.

Ambiente genético del gen $bla_{CTX-M-12}$

La secuencia de inserción *ISEcp1* se detectó en los 21 aislamientos evaluados y las secuencias de inserción *IS26* e *IS903* en 17 y 18 respectivamente. En 9 de los aislamientos se detectaron genes de la integrasa clase I (*Int1*) y el gen de resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario (*qacEΔ*); el gen de resistencia a sulfonamidas (*su1*) en 8 y la *ISCR1* en 5 de los aislamientos evaluados. La secuencia de inserción *ISEcp1* se ha informado corriente arriba (entre 42 a 266 bp) de varios genes bla_{CTX-M} entre ellos los genes que codifican para las enzimas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-20, y CTX-M-21 (Cantón et ál., 2006; Bonnet, 2004; Poirel et ál., 2003; Cao et ál., 2002). En este estudio, la secuencia de inserción *ISEcp1* se detectó en todos los aislamientos y en todos los plásmidos conjugativos portadores del gen $bla_{CTX-M-12}$.

Con la estrategia de “mapeo por PCR” se estableció que el gen $bla_{CTX-M-12}$ se encontraba localizado corriente abajo de la secuencia de inserción *ISEcp1*; el análisis de la secuencia del producto de la amplificación de 2.400 pb obtenido en el “mapeo” mostró que la región

repetida invertida derecha de *ISEcp1* se encontraba localizada corriente arriba del gen $bla_{CTX-M-12}$. De igual manera, corriente abajo de *ISEcp1* se encontraron las secuencias promotoras -35 (TTGAAA) y -10 (TACAAT), que se han descrito como las encargadas de promover la expresión de los genes de resistencia localizados corriente abajo de esta secuencia de inserción, confirmando lo descrito por otros investigadores que han reportado a esta secuencia de inserción como un factor clave en la diseminación de diferentes genes que codifican para cefotaximasas CTX-M del Grupo 1 (Cantón et ál., 2006; Bonnet, 2004; Poirel et ál., 2003; Cao et ál., 2002). (Ver figura 2).

Se detectaron otros elementos genéticos en los aislamientos evaluados. En 8 de los 21 se detectó el gen *int1* y el gen *qacEΔ*. En 6 de estos 8 aislamientos que poseen el gen de integrasa (*int1*) se encontró el gen de resistencia a sulfonamidas *su1* y en 5 el elemento *ISCR1*. Ninguno de los determinantes genéticos antes mencionados se encontró relacionado con el gen $bla_{CTX-M-12}$. Los integrones clase 1 y determinantes genéticos relacionados con estos (genes *su1* y *qacEΔ*) se han descrito asociados a los genes bla_{CTX-M} , de los grupos 2 y 9 (Di Conza et ál., 2002; Sabaté et ál., 2002; Arduino et ál., 2003). En el segmento conservado 3' de estos integrones se encuentra un elemento denominado *ISCR1*, antes conocido como ORF513, el cual cumple una función similar a la secuencia *ISEcp1* en la regulación de la expresión y movilización de los genes de resistencia presentes corriente abajo de esta región común. Se han

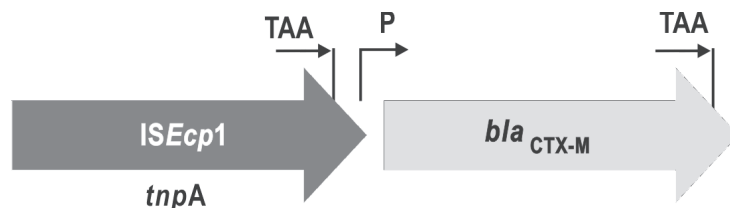


Figura 2. Arreglo genético encontrado en los aislamientos en estudio. Como se observa en la figura, corriente arriba del gen $bla_{CTX-M-12}$ (flecha gris oscuro) se identificó mediante la estrategia de mapeo por PCR la secuencia *ISEcp1* (flecha gris claro) formada por 2 regiones repetidas invertidas a cada extremo y un marco abierto de lectura que codifica para una transposasa (*tnpA*), la flechas en negro indican la dirección de la transcripción.

Tabla 2. Susceptibilidad a antibióticos y descripción del tamaño de los plásmidos en los aislamientos de *K. pneumoniae* y transconjugantes de *Escherichia coli*.

No.	Perfil de resistencia de <i>K. pneumoniae</i>	Tamaño de plásmidos (kpb)*	Perfil de resistencia de <i>E. coli</i>
9	PIP, CTX,CAZ, FEP, ATM, AMK	65	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, AMK
10	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, AMK	65	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, AMK
16	S, NAL, CIP, STX, TE	<u>57</u> y 3	No se evaluó
17	S, NAL, CIP, STX, TE	<u>57</u> y 3	No se evaluó
38	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM,S	81 , 65 , 42 y 10	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM
40	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, AMK, S, STX	106 , 81, 65 y 58	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM
52	PIP, CTX, FEP, ATM,AMK, S, STX	65 y 5	PIP, CTX, FEP, ATM
53	PIP, CTX, ATM,AMK, S, STX	65 y 5	PIP, CTX, ATM
79	PIP, CTX, FEP, ATM, CAZ, AMK, S, STX	<u>52</u> y 5	PIP, CTX, FEP, ATM
89	PIP, CTX, CAZ, FEP,ATM,S, AMK, STX, TE	<u>52</u> , 3	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM
105	PIP, CTX, CAZ, ATM, GEN,FEP, AMK, CIP, STX, TE	65 y 2,6	PIP, CTX, CAZ, ATM, GEN
109	PIP, CTX, CAZ, ATM, GEN,AMK, FEP	65 y 10	PIP, CTX, CAZ, ATM,GEN
119	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM,GEN, S, STX, TE	98, 65 , 10	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM
126	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM,AMK, GEN, STX, TE	98, 65 y 10	PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, AMK ,GEN
133	PIP, CTX, FEP, ATM, AMK,GEN	65	PIP, CTX, FEP, ATM, AMK
142	PIP, CTX, ATM, AMK,S, FEP,TE	65	PIP, CTX, ATM, AMK
169	PIP, CTX, FEP, ATM,CAZ, STX	65 y 18	PIP, CTX, FEP, ATM
220	PIP, CTX, ATM, AMK, GEN, NAL	98 y 65	No se evaluó
236	PIP, CTX, CAZ, ATM, GEN	98 , 57 y 2	PIP, CTX, CAZ, ATM, GEN
290	PIP, CTX, FEP, ATM, GEN,S, STX	65	PIP, CTX, FEP, ATM, GEN
349	PIP, CTX, CAZ, ATM,FEP, TE	65 y 15	PIP, CTX, CAZ, ATM,

Kpb: tamaño en kilo-pares de bases; *Los números subrayados y en negrilla corresponden a los plásmidos portadores del gen *bla_{CTX-M12}*. **AMK:** amikacina, **ATM:** aztreonam, **CAZ:** ceftazidime, **CTX:** cefotaxime, **CIP:** ciprofloxacina, **FEP:** cefepime, **GEN:** gentamicina, **NAL:** ácido nalidíxico, **PIP:** piperacilina, **S:** estreptomicina, **STX:** trimetoprim sulfametoxazol, **TE:** tetraciclina.

descrito varios genes de resistencia asociados con este elemento, entre ellos los genes *catAII* y el gen *dfrA10* que confieren resistencia a cloranfenicol y a trimetoprim respectivamente (Ying-Tsang Chan et ál., 2006). Todos los aislamientos en los que se detectó la *ISCR1*, fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol por tanto, los genes determinantes de esta resistencia pueden estar asociados con dicho ORF y forman parte de los integrones de clase 1 detectados.

Conclusiones

El perfil de susceptibilidad mostró que todos los aislamientos de *K. pneumoniae* investigados presentaban resistencia a cefalosporinas de tercera generación entre otros grupos de antibióticos. Dicha resistencia es causada por la presencia del gen *bla_{CTX-M-12}* que se encontró en plásmidos conjugativos de alto peso molecular. Esta puede ser una de las causas de la diseminación de estos genes de resistencia entre enterobacterias causantes de infección intrahospitalaria.

El gen *bla_{CTX-M-12}* se encontró corriente abajo de la secuencia de inserción *ISEcp1*, la cual contribuye en los procesos de movilización y expresión de este gen. En un alto porcentaje de los aislamientos evaluados se detectaron las secuencias de inserción *IS26* e *IS903* pero no se encontraron asociadas con el gen *bla_{CTX-M-12}*, lo que permite presumir que estas secuencias de inserción pueden estar asociadas con otros genes de resistencia.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la División de Investigaciones de Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, y a Colciencias por la financiación del proyecto.

Referencias bibliográficas

Arduino, S. M., Catalano, M., Orman, B., Roy, P., Centrón, D. 2003. Molecular Epidemiology of *orf513*-Bearing Class 1 Integrons in Multiresistant Clinical Isolates from Argentine Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (12): 3945-3949.

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. et ál. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons. Supplement 8 (3):12.2.
- Bae, I. K., Lee, Y. N., Hawang, H.Y. et ál. 2006. Emergence of CTX-M-12 extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 1257-1259.
- Bennet, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 153: 347-357.
- Bonnet, R., Dutour, J., Sampaio, M. et ál. 2001. Novel cefotaxime (CTX-M-16) with increase catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gli. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 45: 2269-75.
- Bonnet, R. 2004 Growing group of extended-spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 48 (1): 1-14.
- Cao, V., Lambert, T., Nhu, D. Q. et ál. 2002. Distribution of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 46: 3739-43.
- Cantón, R., Coque, T. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 9: 1-10.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. Coque, T. 2008. Prevalence and Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Europe. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 (1): 144-153.
- Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J. et ál. 2002. Characterization of extended-spectrum [β]-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiology Letter* 184 (1): 85-89.
- Clinical Laboratory Standard Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 259 eighteenth informational supplement, CLSI document M100-S18. Clinical 260 Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Di Conza, J., Ayala, J. A., Power, P., Mollerach, M., Gutkind, G. 2002. Novel class 1 integron (*InS21*) carrying *bla_{CTX-M-2}* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 2257-61.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. 2007. Modes and Modulations of Antibiotic

- Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 79-114.
- Eckert, C., Gautier, V., Arlet, G. 2006. DNA sequence analysis of the environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 14-24.
- Gniadkowski, M. 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (1): 11-32.
- Jacoby, G. A., Munozs-Price, L. S. 2005. The New β -lactamases. *The New England Journal of Medicine* 352: 389-391.
- Kariuki, S., Corkill, J., Revathi, G. et ál. 2001. Molecular characterization of a novel Plasmid-Encoded-Cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 45 (7): 2141-43.
- Lartigue, M. F., Poirel, L., Nordmann, P. 2004. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiology Letter* 234: 201-207.
- Leal, A., Olarte, N., Espinal, P. et ál. 2003. Caracterización epidemiológica y molecular de un brote causado por *Klebsiella pneumoniae* productor de CTX-M del grupo 1 en una unidad de cuidados intensivos neonatal en un hospital de Bogotá. *Infectio* 7 (2): 99.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P. 1995. PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 39 (1): 185-191.
- Livermore, D. M., Cornaglia, G. 2008. Living with ESBLs. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (1): 1-2.
- Machado, E., Cantón, F., Baquero, F., Galán, J.C., Rollan, A., Peixe, L., Coque, T. 2005. Integron Content of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 49 (5): 1823-1829.
- Mammeri, H., Van de Loo, M., Poirel, L., Martinez, L., Nordmann, P. 2005. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 49 (1): 71-76.
- Mantilla, J. R., Valenzuela, E. M., González, E., Mendez, E. M., Leal, A. L. 2004. Alta prevalencia de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en *Enterobacteriaceae*, asociadas a infección intrahospitalaria en Bogotá. *Infectio* 8 (2): 143.
- Mantilla, J. R., Valenzuela, E. M., Gil, C. A., Leal, A. L. 2004. Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido BLEE del tipo CTX-M-12. *Infectio* 8 (2): 143.
- Mantilla, J.R., Reguero, M.T., González, E.B., García, I.A. et ál. 2006. Caracterización Molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. *Biomédica* 26: 408-414.
- Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J., Peixe, L. et ál. 2006. Dissemination and Persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to Class 1 Integrons Containing CR1 with Defective Transposon Derivatives from Tn402 Located in Early Antibiotic Resistance Plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI Groups. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 50: 2741-2750.
- Poirel, L., Decousser, J. W., Nordmann, P. 2003. Insertion Sequence ISEcp1B Involved in Expression and Mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -Lactamase Gene. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 47: 2741-2750.
- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. 2008. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (1): 75-81.
- Sabaté, M., Navarro, F., Miro, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbe, J., Prats. 2002. Novel Complex *sul1*-Type Integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 46 (8): 2648-2651.
- Tran, Q. T., Dupont, M., Lavigne, J. P., Chevalier, J., Pagès, J. M., Sotto, A., Anne Reglil, D. 2009. Occurrence of Efflux Mechanism and Cephalosporinase 1 Variant in a Population of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*. *On line* doi:10.1128/AAC.00822-08.
- Valenzuela, E. M., Mantilla, J. R., Reguero, M. T., González, E. B., Pulido, I. Y., Llerena, I. D., Velandia, D. 2006. Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Bogotá, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (5): 1919-1920.
- Velandia, D. A. 2008. Identificación de variantes del gen *bla*_{CTX-M-1} en aislamientos de enterobacterias procedentes de doce hospitales pertenecientes a la red adscrita a la Secretaría Distrital de Salud. Bogotá. Tesis Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- Villegas, M., Kattan, J., Quinteros, M., Casellas, J. 2008. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (8): 154-158.

Ying-Tsong, Chen et al. 2006. Complete Nucleotide Sequence of pK245, a 98-Kilo-base Plasmid Conferring Quinolone Resistance and Extended-Spectrum- β -

Lactamase Activity in a Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolate. Antimicrobials Agents and Chemotherapy 50 (11): 3861-3866.